

University of Groningen

## Dynamic combinatorial and protein-templated click chemistry in medicinal chemistry

Mondal, Milon

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Mondal, M. (2016). *Dynamic combinatorial and protein-templated click chemistry in medicinal chemistry*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

---

## Samenvatting

---

Aspartaatproteasen zijn een klasse van enzymen die veelvuldig gevonden worden in schimmels, planten, gewervelden, alsmede in hiv retro-virussen. Deze enzymen hebben een oorzakelijke rol in verscheidene ziekten zoals hypertensie, amyloïdose, malaria, schimmelinfecties en aids. In hiv heeft het aspartaatprotease een essentiële rol in de maturatie van het hiv-virus, waardoor het een belangrijk doelwit is voor de behandeling van aids. In eukaryoten speelt het aspartaatprotease renine een rol in hypertensie, kathepsine D in tumorgenese, en pepsine in de hydrolyse van zuur-gedenatureerde eiwitten. Derhalve worden de enzymen van deze klasse van aspartaatproteasen gezien als een rijke bron voor therapeutische doelwitten.

We hebben in dit proefschrift uiteengezet dat fragment-gebaseerd medicijn ontwerp (FGMO) en structuur-gebaseerd medicijn ontwerp (SGMO) nog een aantal uitdagingen kennen, zoals het risico gerelateerd aan *de novo* SGMO. Daarnaast zijn ze tijdsintensief aangezien ze de synthese en validatie van de bindingswijze van ieder derivaat in de fragment/hit-optimalisatie cyclus met zich meebrengen. Om deze belemmeringen te overwinnen hebben we FGMO en *de novo* SGMO projecten gecombineerd met dynamische combinatorische chemie (DCC) of eiwit-gerichte klikchemie (EGKC) om identificatie/optimalisatie van hits/leads meer efficiënt te maken, waarbij we gebruik hebben gemaakt van het aspartaatprotease endothiasepsin als een model systeem.

De belangrijkste resultaten beschreven in dit proefschrift zijn: 1) de ontwikkeling van een krachtige techniek die *de novo* SGMO en DCC combineert om snel nieuwe hits te identificeren, 2) de ontwikkeling van een efficiënte aanpak die fragment-linken en DCC combineert om hit-to-lead optimalisatie te versnellen, 3) optimalisatie van een eerste hit, 4) de ontwikkeling van een techniek die fragment-groei combineert met DCC voor een snelle optimalisatie van een fragment, en 5) de ontwikkeling van een methode die fragment-linken/optimalisatie en EGKC combineert om het hit-identificatie proces te versnellen waarbij gebruik werd gemaakt van het aspartaatprotease endothiasepsin als model enzym.

In Hoofdstuk 1 van dit proefschrift, discussiëren we de toepassing van DCC in de ontdekking van binders van een reeks aan eiwitdoelwitten. Sinds het eerste

verslag van DCC toegepast op de ontdekking van binders voor een eiwit, is deze elegante toepassing gebruikt voor een reeks van eiwitdoelwitten in verschillende stadia van medicinale-chemie projecten. Een serie van geschikte, reversibele reacties die biocompatibel zijn, zijn ontwikkeld en het portfolio van analytische technieken is groeiende. Ondanks deze vooruitgang zijn de gebruikte bibliotheken, in de meeste gevallen, van beperkte grootte gebleven. In Hoofdstuk 1, bespreken we de meest recente vooruitgang op het gebied van DCC toegepast op eiwitdoelwitten, waarbij speciaal wordt gelet op de experimentele condities en de gekozen analytische methoden. We geven een overzicht van SGM0 en FGMO en ook hun beperkingen worden besproken. We geven een bondige introductie van een klasse van aspartaatproteasen en waarom deze eiwitten gezien worden als een rijke bron voor therapeutische doelwitten die, als algemeen bekend, moeilijk zijn. Tenslotte discussiëren we de strategische combinaties van computationele studies en analytische technieken, die de identificatie/optimalisatie van hits/lead van het aspartaatprotease endothiapepsin zouden kunnen versnellen.

In Hoofdstuk 2, demonstreren we voor de eerste keer dat de combinatie van *de novo* SGM0 en DCC een krachtige techniek is voor een snelle identificatie van nieuwe hits die het aspartaatprotease endothiapepsin remmen. We maken gebruik van <sup>1</sup>H-STD-NMR spectroscopie om binders direct uit de dynamische combinatorische bibliotheek (DCB) te kunnen identificeren. Van de geïdentificeerde hits hebben de beste hits IC<sub>50</sub> waarden in het laag micromolaire bereik. Daarnaast bevestigde een bepaling van de co-kristalstructuur onze *in silico* voorspelling dat of direct of water-gemedieerde interacties met de katalytische dyad bereikt kunnen worden. We hebben een eerste voorbeeld beschreven van acylhydrazon-gebaseerde remmers van endothiapepsin en van aspartaatproteasen in het algemeen.

In Hoofdstuk 3, beschrijven we dat de synergistische combinatie van fragment-linken en DCC een krachtige en efficiënte strategie is om hit-to-lead optimalisatie te versnellen van het aspartaatprotease endothiapepsin. We hebben ervoor gekozen om twee co-kristalstructuren van endothiapepsin met acylhydrazon-gebaseerde hits als startpunt voor fragment-linken te gebruiken. Voorafgaand hieraan hebben we deze hits geïdentificeerd via een acylhydrazon-gebaseerde DCB, waarbij gebruik werd gemaakt van de synergistische combinatie van *de novo* SGM0 en DCC zoals gerapporteerd in Hoofdstuk 2. We maken gebruik van LC-MS analyse om de beste binders direct uit de DCB's te identificeren. De beste

binder heeft een  $IC_{50}$  waarde van 54 nM, dit betekent een 240-voudige verbetering in potentie ten opzichte van de oorspronkelijke hits. Vervolgens hebben co-kristallisatie studies onze *in silico* voorspellingen bevestigd.

In Hoofdstuk 4, ontwerpen we een bibliotheek van acht acylhydrazon-gebaseerde inhibitoren uitgaande van een hit, die gerapporteerd werd in Hoofdstuk 2, door gebruik te maken van SGMO. In het bijzonder hebben we onze aandacht gericht op het optimaliseren van een amide- $\pi$  interactie. Deze verbindingen remmen het aspartaatprotease endothiapepsin met  $IC_{50}$  waarden in het laag micromolaire bereik. De beste verbinding laat een  $IC_{50}$  waarde van 7.0  $\mu$ M zien, met een tweevoudig hogere potentie dan de originele hit. Deze toename in potentie zou zijn oorzaak kunnen vinden in een versterkte amide- $\pi$  interactie vergeleken met de originele hit, die kan worden veroorzaakt door de sterkere elektron-zuigende eigenschappen van de trifluoromethylgroep alsmede betere lipofiele interacties. Voorts zou het een betere metabolische stabiliteit kunnen hebben vergeleken met de originele hit door de aanwezigheid van een trifluoromethylgroep in plaats van drie methylgroepen.

In Hoofdstuk 5, laten we voor het eerst zien dat de combinatie van fragment groeien en DCC een krachtige techniek is voor een snelle optimalisatie van initiële fragmenten voor het aspartaatprotease endothiapepsin. Bovendien, door gebruik te maken van een op fluorescentie-gebaseerd assay, kunnen we direct de DCB's screenen voor actieve remmers. De voordelen van deze aanpak zijn dat slechts zeer kleine hoeveelheden eiwit nodig zijn in vergelijking met de bestaande analytische methoden en dat het eiwit alleen gedurende een korte periode in het assay mengsel aanwezig hoeft te zijn, wat dit protocol ideaal maakt voor kostbare en onstabiele eiwitten. Van de geïdentificeerde acylhydrazonen heeft de meest potente inhibitor een  $IC_{50}$  waarde van 85  $\mu$ M.

In Hoofdstuk 6, laten we zien dat de strategische combinatie van fragment linken/optimalisatie en EGKC een efficiënte en krachtige methode is die het hit-identificatie proces versnelt voor het aspartaatprotease endothiapepsin. We maken gebruik van de zeer gevoelige UPLC-TOF-SIM methode om de triazol verbindingen, gefaciliteerd door het eiwit, te kunnen identificeren. De beste binder remt endothiapepsin met een  $IC_{50}$  waarde van 43  $\mu$ M. Als gevolg van de beperkte oplosbaarheid van de geïdentificeerde triazolen waren we niet in staat om kristallen te verkrijgen van een triazol in het complex met endothiapepsin. Voorts beschrijven we het eerste voorbeeld van triazol-gebaseerde inhibitoren van endothiapepsin. Het grote voordeel van deze aanpak is dat een katalytische

hoeveelheid van het eiwit voldoende is om de vorming van triazolen te initiëren en te versnellen uit een voldoende grote bibliotheek. Terwijl daarentegen dit een belangrijke overweging is voor kostbare eiwitten, is het een nadeel dat het eiwit stabiel dient te zijn op kamertemperatuur voor langere periodes, waardoor het aantal compatibele doelwitten aanzienlijk wordt verminderd.

Gebaseerd op deze resultaten kan geconcludeerd worden dat verscheidene combinaties van computationele en analytische technieken synergetisch zijn en de identificatie/optimalisatie van hits/leads voor het aspartaatprotease endothiapepsin faciliteren.